

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**Caracterização funcional, estrutural e
mecanismo de ação dos novos inibidores de
entrada do HIV**

Leida Simone Lima Mota

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2019

Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia



**Caracterização funcional, estrutural e
mecanismo de ação dos novos inibidores de
entrada do HIV**

Leida Simone Lima Mota

**Monografia de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
apresentada à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

Orientadora: Professora Doutora Quirina dos Santos Costa

2019

Resumo

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) está na origem da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, SIDA, onde ocorre a debilitação do sistema imunitário de tal forma que o organismo perde a capacidade de combater infecções oportunistas, levando assim à morte. O HIV liga-se à células que expressam o recetor CD4 através da sua glicoproteína de superfície, a gp120 e funde-se através da sua glicoproteína transmembranar, a gp41.

Atualmente, graças à terapêutica com os fármacos antirretrovirais, a infeção passou a ser considerada crónica, estando o indivíduo infetado por décadas, com alguma qualidade de vida. Embora ainda não levem a uma cura, os antirretrovirais representaram um grande avanço na luta contra o HIV e a SIDA.

Por ser cada vez mais difícil tratar os indivíduos infetados com as terapêuticas existentes devido à capacidade do HIV em desenvolver resistência a esses fármacos e por causa dos seus efeitos adversos significativos que podem levar à falência da terapêutica e aumentar a possibilidade de surgirem mutações, tornou-se necessário pesquisar novos fármacos, que ultrapassassem essas limitações. Um fármaco que se mostrou promissor foi a enfuvirtida, ou T20. Por ter um mecanismo diferente, ao atuar na primeira fase de replicação do vírus por inibição da fusão, há um elevado interesse por parte dos investigadores em explorar mais fármacos com o mesmo mecanismo de ação. A enfuvirtida, quando descoberta, mostrou levar à supressão do vírus, em combinação com outros fármacos, em indivíduos infetados que não respondiam às outras terapêuticas e demonstrou possuir elevado perfil de segurança. Contudo, a enfuvirtida apresenta muitas desvantagens, como o fato de não ter biodisponibilidade oral, sendo necessária a sua administração por via subcutânea, o surgimento de reações no local de injeção, a necessidade de requerer altas doses, o tempo de meia vida curto e o aparecimento de mutantes resistentes. Assim, com base na sua estrutura e no seu mecanismo de ação, foram desenvolvidos outros péptidos, que apresentavam vantagens relativamente à enfuvirtida. O presente trabalho faz uma pequena introdução de fármacos que foram desenvolvidos depois do T20, como o T1249, o HP23, o 2P23, o LP-11, o LP-40 e LP-46 até chegar aos mais recentes, com melhores propriedades antivirais e farmacológicas, como o LP-50, LP-51 e LP-52. É demonstrado como estes últimos são vantajosos relativamente ao T20 e como são promissores para o tratamento da infeção por HIV.

Palavras Chave: HIV, fusão de membranas, inibidores de fusão, enfuvirtida, lipopéptidos

Abstract

The Human Immunodeficiency Virus (HIV) is in the origin of Acquired Immunodeficiency syndrome (AIDS), where occurs the weakness of the immune system in a way that the body loses its capacity to fight opportunistic infections, leading to death. HIV can attach to cells that express the CD4 receptor, using the surface glycoprotein gp120 and fuse through the transmembrane glycoprotein, gp41.

Nowadays, thanks to antiretrovirals therapeutics, the infection became chronic, with the individual being infected for decades, with some quality of life. Antiretrovirals did represent a great advance in the fight against HIV and AIDS, although they don't lead to a cure.

Because of the capacity of HIV to develop resistance against antiretrovirals pharmaceuticals, it is getting harder to treat patients with conventional therapeutics. The significant side events of them, can cause the therapeutic failure and emergence of mutations.

Due to these problems, the search for new antiretrovirals that can overcome those problems became urgent. A drug that proved to be promising was enfuvirtide, also called T20. Because of its unique mechanism of action acting at the first step of virus replication at inhibition of fusion, there is a special interest to exploit similar drugs with greatest properties. When it was discovered, enfuvirtide showed the capacity of suppress the virus, in combination with other drugs, on patients that didn't respond to other therapeutics. However, enfuvirtide has a lot of disadvantages, like the fact that it doesn't possess oral viability, requiring subcutaneous administration, the requirement of high doses, the low half time and the emergence of mutations. Thus, basis on enfuvirtide, they have been developed other peptides, with some advantages when compared to enfuvirtide. This work did a little introduction of drugs developed after T20, like T1249, HP23, 2P23, LP-40, LP-46, until reach the most current, with better antiviral and pharmacological properties, like LP-50, LP-51 and LP-52. It is demonstrating how these last ones are more potent than T20 and how promising they are to HIV treatment.

Keywords: HIV, membrane fusion, fusion inhibitors, enfuvirtide, lipopeptides

Dedicatória

Quero manifestar o meu sincero agradecimento a várias pessoas que, de uma forma ou de outra, contribuíram para que este trabalho fosse concretizado.

À minha orientadora, a Professora Doutora Quirina Costa, por todo o apoio, disponibilidade e orientação que deu ao longo de todo o trabalho.

Às minhas amigas e colegas do curso, Ariel, Erdivânea, Cátia, Kátia, Katy, por terem sido companheiras ao longo do percurso e por nos termos umas às outras como apoio em momentos difíceis. Em especial, a Ariel que sempre esteve comigo, sempre me apoiou e me inspirou. A tua amizade e o teu companheirismo foram fundamentais para que eu chegasse a esta etapa.

Obrigada aos meus amigos, Erina, Nuias, Erivaldo, Kilian, Miriam, que sempre me apoiaram ao longo do meu percurso académico. O vosso amor foi essencial e indispensável.

Obrigada Rachid, por teres partilhado os teus conhecimentos, pela tua orientação que me foi muito importante, pelas palavras de motivação e pelos “puxões de orelha”.

Principalmente, obrigada pai, mãe e irmão. Eu nunca teria chegado até aqui se não fosse por vocês. Obrigada por terem sempre acreditado em mim. Obrigada pelo vosso amor, carinho, motivação e esforço. Obrigada por terem feito de tudo para que o meu sonho se realizasse.

À minha mãe, Joana, obrigada por tudo. Tu és a minha motivação e a razão da minha luta. Quero que saibas que o diploma é meu e teu. Espelhei-me na grande mulher, forte e lutadora que tu és, para batalhar por mim. Espero, um dia, ser uma mulher como tu.

Obrigada a todos que, de alguma forma, contribuíram ao longo desta minha longa caminhada.

Índice Geral

Resumo	4
Abstract	5
Dedicatória	6
Índice Geral	7
Índice de tabelas	9
Acrónimos/Siglas	10
Introdução	10
Capítulo I - O Vírus da Imunodeficiência Humana	10
1. Definição e Generalidades	10
2. Morfologia e genoma	11
3. Ciclo de replicação	13
3.1. Fusão e entrada	13
3.2. Transcrição reversa	15
3.3. Integração	15
3.4. Replicação e Maturação	15
Objetivos do trabalho	15
Materiais de métodos	16
Capítulo II- Antirretrovirais	16
4. Classificação, função e mecanismos de ação	16
5. Desafios no uso de antirretrovirais	17
Capítulo III- Inibidores de entrada do HIV	18
6. Inibidores de Fusão: Enfuvirtida ou T-20	19
6.1. Desenvolvimento de péptidos inibidores de Fusão	19
6.2. Mecanismo de ação da Enfuvirtida (T-20)	20
6.3. Desenvolvimento clínico da Enfuvirtida	21
6.4. Um caso clínico envolvendo Enfuvirtida	23
7. Desenvolvimento de novos inibidores de entrada do HIV	25
7.1. Inibidores de fusão de segunda e terceira geração	25
7.1.1. Desenvolvimento dos lipopéptidos LP-40 e LP-46	27
7.1.2. Desenvolvimento dos lipopéptidos LP-50 e LP-51	30
7.1.3. Desenvolvimento de LP-52	34
Conclusão	38
Referências Bibliográficas	39

Índice de Figuras

Figura 1. Prevalência de HIV entre adultos com idades compreendidas entre os 15 e os 49 anos, por regiões da OMS	10
Figura 2. Origem do vírus HIV	11
Figura 3. Representação esquemática de uma partícula de HIV-1 madura	12
Figura 4. Organização do genoma do HIV-1	13
Figura 5. Passos que levam à fusão do HIV-1 à membrana da célula alvo.	14
Figura 6. Estrutura molecular da Enfuvirtida.....	19
Figura 7. Estrutura esquemática da gp41 do HIV-1	20
Figura 8. Mecanismo de ação da enfuvirtida	21
Figura 9. Representação esquemática dos subdomínios de gp41 e dos inibidores de fusão baseados em HR2 (T20 e T1249).....	26
Figura 10. Caraterização esquemática de HIV-1 e péptidos baseados em CHR e NHR de gp41	31
Figura 11. Propriedades dos novos inibidores determinadas por espectroscopia DC	32
Figura 12. Eficácia terapêutica de LP-51 em macacos rhesus infetados por SHIV.....	34
Figura 13. Representação esquemática da estrutura gp41 do HIV e dos péptidos derivados de NHR e CHR	35

Índice de tabelas

Tabela 1. Inibição de mutantes de HIV-1 resistentes à medicação, utilizando LP-40, HP23 e LP-11.....	29
Tabela 2. atividade inibitória de lipopéptidos inibidores de fusão contra mutantes resistentes ao T20 de HIV-1, isolados de HIV-2 e isolados de SIV.	33

Acrónimos/Siglas

ARV- Antirretroviral

CA- Cápside

CD4- *Cluster of Differentiation 4*

CCR5- *C-C Motif Chemokine Receptor 5*

CC₅₀ – Concentração Citotóxica em 50%

Chol- Colesterol, do inglês, *Cholesterol*

CHR- *C-terminal Heptad Repeat*

CMV- Citomegalovírus

CT- *cytoplasmatic tail*

CXCR4- *C-X-C chemokine receptor type 4*

CYP450- Citocromo P450

DNA- ácido desoxirribonucleico, do inglês, *deoxyribonucleic acid*

FDA- *Food and Drug Administration*

FP- Péptido de Fusão, do inglês, *Fusion Peptide*

Gag- *Group-specific antigen*

Gp- glicoproteína

Env- Envelope

HIV- Vírus da Imunodeficiência Humana, do inglês, *Human Immunodeficiency Virus*

HR1- *Heptad Repeat 1*

HR2- *Heptad repeat 2*

HSA- Albumina Sérica Humana, do inglês, *Human Seric Albumin*

IC₅₀ – Concentração Inibitória em 50%

IN- Integrase

INTR- Inibidores Nucleosídicos da Transcritase Reversa

INNTR- Inibidores não Nucleosídicos da Transcritase Reversa

ITI- Inibidores de Transferência de cadeia da Integrase

LBD- *Lipid Binding Domain*

LP- lipopéptido

MA- Matriz

mg- miligrama

ml- mililitro

mm³- milímetros cúbicos

mRNA- Ácido Ribonucléico mensageiro, do inglês, *Messenger Ribonucleic acid*

Nab- Anticorpo Neutralizador, do inglês, *Neutralizer Antibody*

NC- Nucleocápside

NHR- *N-terminal Heptad Repeat*

nM- nanómetro

OMS- Organização Mundial da Saúde

PBD- *Pocket-binding domain*

PIC- Complexo de Pré- Integração, do inglês, *Pre- Integration Complex*

Pol- Polimerase

PR- Protease

pM- picómetro

RNA- Ácido Ribonucléico, do inglês, *Ribonucleic acid*

RTC- Complexo de transcrição reversa, do inglês, *Reverse Transcription Complex*

SAR- relação estrutura-atividade, do inglês, *Structure- Activity Relation*

SIV- Vírus de Imunodeficiência Símia, do inglês, *Simian Immunodeficiency Virus*

SHIV- *Simian and Human Immunodeficiency Virus*

SU- glicoproteína de Superfície

TARc- Terapêutica Antirretrovírica combinada

TORO- *T20 versus Optimized Regimen Only*

TRM- *Tryptophan Rich Motif*

μM- micrómetro

Introdução

Capítulo I - O Vírus da Imunodeficiência Humana

1. Definição e Generalidades

Em 1981 surgiu um número cada vez maior de jovens a contrair infecções oportunistas e malignidades raras. Qualquer que fosse o agente causal dessas infecções, o sistema imunitário não conseguia combater a infecção, o que resultava na morte do indivíduo. Assim a Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA) passou a ser conhecida (1,2). Desde a sua descoberta até então, mais de 70 milhões de pessoas foram infectadas e cerca de metade morreu de SIDA (3,4). Segundo a OMS, em novembro de 2018 estimou-se que o número de pessoas, de todas as idades, vivendo com HIV, a nível global é de 37,9 milhões (32,7-44,0 milhões) (4). O agente causal da SIDA é o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (1,2,5). É um vírus transmitido através de certos fluidos corporais e que infeta o sistema imunitário, especificamente as células TCD4+ (6). Para controlar a epidemia da SIDA, durante a década de 80 foram feitos diversos estudos, todos focados no conhecimento da bioquímica e da biologia estrutural do HIV (7). Foi necessário compreender os mecanismos pelos quais se dá a replicação do vírus, para encontrar formas de parar a progressão deste para SIDA (5). Graças a estes estudos e aos conhecimentos que foram sendo adquiridos, foram-se desenvolvendo fármacos antirretrovirais eficazes para o tratamento da infecção por HIV (5).

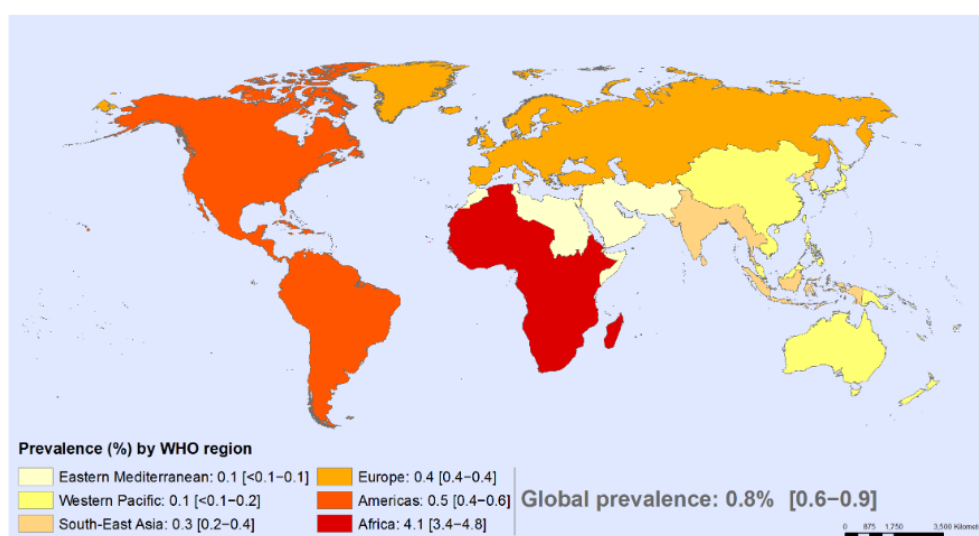


Figura 1. Prevalência de HIV entre adultos com idades compreendidas entre os 15 e os 49 anos, por regiões da OMS. Adaptado de (4)

Existem dois tipos de HIV, o HIV-1 e o HIV-2. Ambos contêm um invólucro e cadeias de RNA positivas, são transmitidos da mesma forma e são necessários ensaios específicos para os distinguir (8). A infecção pelo HIV-1 é um processo altamente dinâmico visto que tem uma alta taxa de replicação viral e uma alta quantidade de vírus no plasma. A sua patogenicidade encontra-se relacionada com a quantidade de carga viral no plasma (9). Esta é menor nos indivíduos infetados por HIV-2 do que nos infetados por HIV-1, sendo por isso que a transmissão de HIV-2 tem taxas mais baixas. O HIV-2 encontra-se restrito à África Ocidental, enquanto que o HIV-1 tem infetado milhões de pessoas por todo o planeta (1). Ambos os tipos surgiram como consequência de múltiplos cruzamentos entre espécies de Vírus de Imunodeficiência Símia (SIV), infetando primatas africanos (10). Com o tempo, humanos começaram a ser infetados (1).

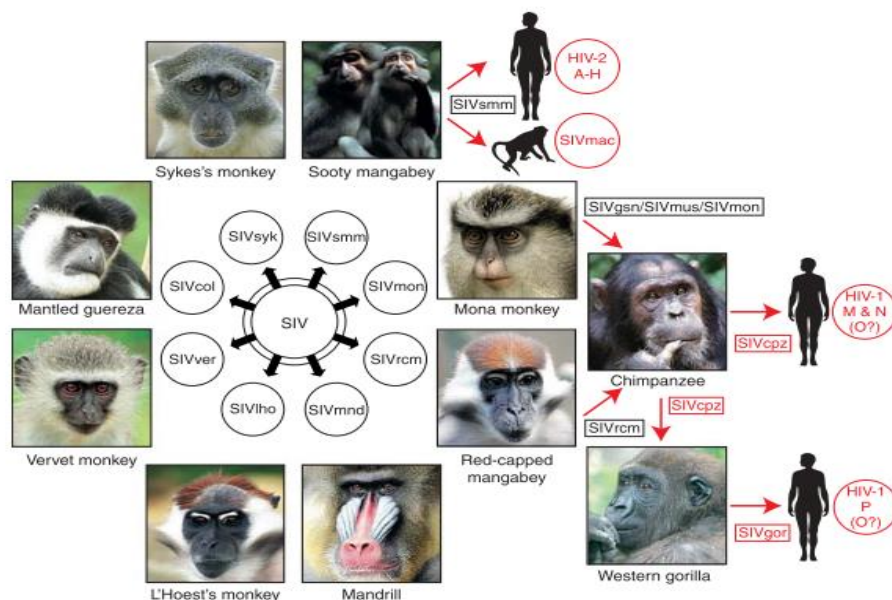


Figura 2. Origem do vírus HIV. Macacos por todo o mundo são infetados naturalmente por mais de 40 espécies de lentivírus diferentes, denominados Vírus de Imunodeficiência Símia (SIV). Alguns desses SIV cruzaram a barreira de espécie, gerando novos agentes patogênicos. Exemplos de transmissões cruzadas entre espécies e os vírus resultantes estão marcados à vermelho. Adaptado de (1)

2. Morfologia e genoma

O HIV é um retrovírus do género lentivírus. Os retrovírus têm como genoma o RNA que, dentro da célula hospedeira, é transcrito em DNA viral pela enzima Transcritase Reversa (RT). Possui um genoma complexo e uma cápside em forma de cone (7) e, assim como todos os retrovírus, o seu invólucro é constituído por uma bicamada lipídica com origem na membrana da célula hospedeira (7). Na bicamada lipídica, está a glicoproteína de superfície

(SU, gp120), ancorada ao vírus através da Glicoproteína Transmembranar (TM, gp41). Estas glicoproteínas são fundamentais para a ligação e entrada do vírus à célula hospedeira. O vírus tem uma matriz, constituída pela proteína de matriz (MA, p17), que preenche a parte interior da membrana viral, e tem a cápside constituída pela proteína da cápside (CA, p24) formando assim o 'core' viral. Dentro da cápside, encontram-se duas cópias do RNA viral, diretamente ligadas à proteína da nucleocápside (NC ou p7), que as estabiliza; e encontram-se as enzimas virais essenciais, a protease (PR), a Integrase (IN) e a Transcritase Reversa (RT) (7). A sua estrutura encontra-se esquematizada na figura 3.

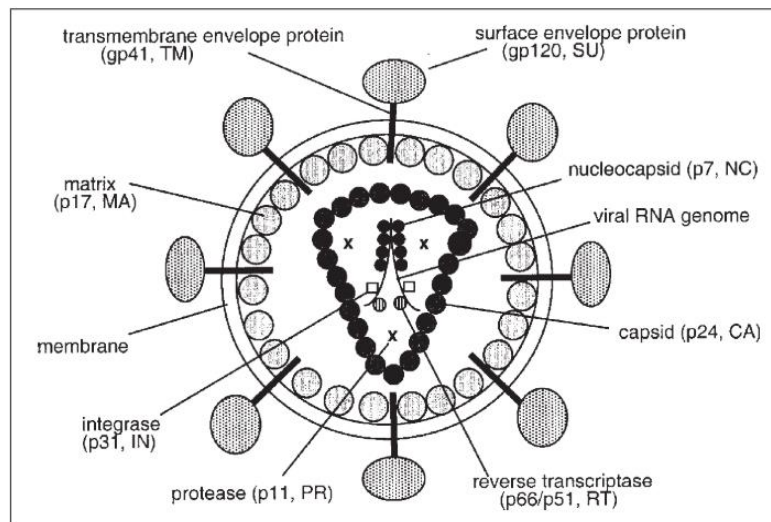


Figura 3. Representação esquemática de uma partícula de HIV-1 madura. Todas as proteínas estruturais, a bicamada lipídica, o genoma e as enzimas estão indicadas. Adaptada de (10)

O genoma pró viral do HIV-1, do terminal 5' ao terminal 3', é constituído por genes que codificam para as proteínas estruturais, reguladoras e acessórias. Encontramos o gene *Gag*, para grupos específicos de antígenos, o gene *Pol*, para polimerase e *Env*, para glicoproteínas do invólucro (10). Para as proteínas reguladoras temos os genes *Tat* e *Rev*, e para proteínas acessórias temos os genes *Nef*, *Vif*, *Vpu* e *Vpr* (figura 2) (2,10). O *gag* codifica para a poliproteína precursora Pr55 que, quando clivada pela protease viral, dá origem às proteínas da matriz (MA ou p17), da cápside (CA ou p24) e da nucleocápside (NC ou p7 e p6) (10). A poliproteína precursora, Pr 160 *GagPol*, codificada pelo gene *pol*, é clivada pela protease viral, originando as enzimas RT, IN e PR (10).

A proteína precursora do *Env*, gp160, diferente das outras, é clivada pela protease celular quando o *Env* se desloca para a superfície celular. Resulta, assim, na glicoproteína de superfície (SU, gp120) e na glicoproteína transmembranar (TM, gp41). A gp120, por sua vez, é organizada em cinco regiões conservadas (C1- C5) e cinco domínios variáveis, (V1-V5). A gp41 organiza-se em três domínios, que são o ectodomínio, que é determinante no processo de fusão, o domínio transmembranar e a cauda citoplasmática (10). O ectodomínio é constituído por três partes: o péptido de fusão, que contém um terminal N altamente hidrofóbico, e dois motivos constituídos por sete sequências cada, que são o hélice N (NHR ou HR1) e o hélice C (CHR ou HR2) (10,11).

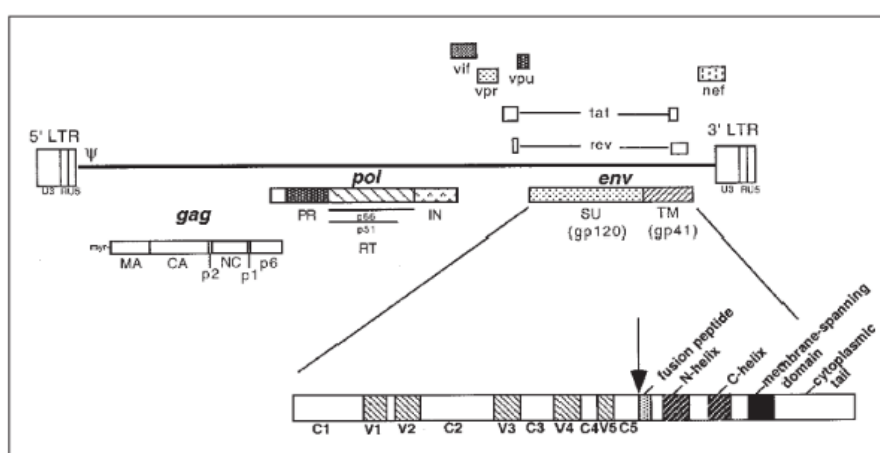


Figura 4. Organização do genoma do HIV-1. Mostra os genes *Gag*, *Pol* e *Env*. Em baixo do gene *gag*, são mostrados os domínios MA, CA, NC e p6, e os péptidos espaçadores, p2 e p1. Em baixo do gene *Pol* estão os domínios PR, IN e RT, este último constituído pelos subdomínios p66 e p51. Em baixo do gene *Env*, vemos as glicoproteínas SU e TM (gp120 e gp41 respetivamente). As glicoproteínas estão amplificadas de modo a ver as posições das regiões conservadas (C1-C5) e variáveis (V1-V5) da gp120, e a localização do péptido de fusão, as hélices N e C, o domínio transmembranar e a cauda citoplasmática da gp41. Adaptado de (10)

3. Ciclo de replicação

3.1. Fusão e entrada

Quando se deu a epidemia da SIDA, observou-se que o vírus se liga e leva à depleção dos linfócitos TCD4+ no sangue. Mais tarde, foi estabelecido que o vírus se liga especificamente aos recetores de superfície CD4 (10). A gp120 do vírus determina o reconhecimento e a ligação do vírus ao CD4 e a gp41 medeia a fusão entre as membranas celular e viral (12). As regiões conservadas C3 e C4 da gp120, representadas na figura 4, são as regiões primariamente envolvidas na ligação ao CD4 (10). Mas, somente o CD4 não é suficiente para que ocorra a ligação e entrada do vírus na célula hospedeira. Há 2 co-recetores muito

importantes, o recetor de quimiocina α CXCR4 e o recetor de quimiocina β CCR5 (10). Nos primeiros estágios da infeção pelo HIV, o tropismo do vírus para o CCR5 é predominante (13). Na ligação, ocorre a formação de um complexo ternário entre a gp120, o CD4 e o co-receptor (10). A ligação de gp120 ao CD4 faz com que gp120 exponha o seu sítio de ligação ao co-receptor, e assim se liga ao CCR5 ou CXCR4, conforme for o tropismo do HIV-1 (3,10). Depois, ocorrem alterações conformacionais no complexo gp120/gp41. Os rearranjos a seguir à ligação à célula-alvo, permitem que o terminal N do péptido de fusão da gp41 seja inserido na membrana da célula hospedeira, formando um intermediário nomeado pré-harpina que liga as membrana celular e viral (3,10,14). Este intermediário continua a sofrer alterações e o CHR (ou HR2) e o NHR (ou HR1) rearranjam-se formando um feixe de 6 hélices (6-HB ou harpina) que contém três membros (trímero) de cada domínio, ou seja, o CHR dobra-se e liga-se através do seu domínio conhecido por “pocket-binding domain” (PBD), em posição antiparalela aos 3 sulcos hidrofóbicos, conservados na face externa do NHR, libertando energia que aproxima o vírus da célula e que permite que, finalmente, ocorra a fusão e a libertação do genoma dentro do citoplasma da célula (3,10,11).

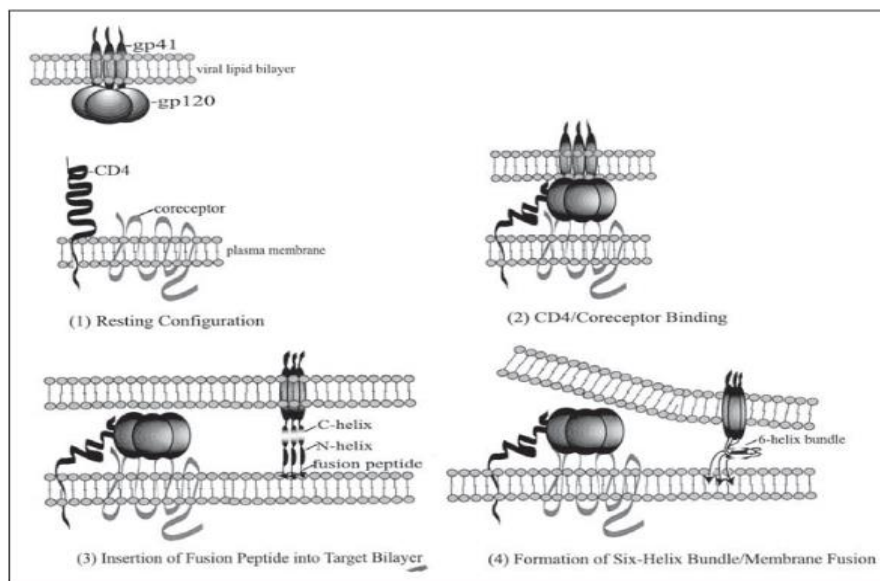


Figura 5. Passos que levam à fusão do HIV-1 à membrana da célula alvo. O (1) mostra o complexo gp120/gp41 do vírus, o recetor CD4 e o coreceptor da célula hospedeira. (2) mostra a ligação de gp120 ao CD4 e interação com o coreceptor levando a mudanças conformacionais em gp120 e gp41. (3) o ectodomínio de gp41 interage com a membrana celular e o péptido de fusão é inserido na bicamada lipídica do hospedeiro (4). Os hélices C e N dobram-se formando o 6-HB e aproximam as membranas, permitindo que ocorra a fusão. Adaptado de (10).

3.2. Transcrição reversa

Depois da fusão, o “core” do vírus entra no citoplasma da célula hospedeira, é convertido num complexo designado de complexo de transcrição reversa (RTC) e, depois, num complexo de pré integração (PIC). A transcrição reversa é então catalisada pela enzima RT, em que o RNA do vírus é convertido em DNA de cadeia dupla (7,10).

3.3. Integração

Depois da síntese do DNA viral, este é transportado para o núcleo da célula como parte do PIC, de que também fazem parte as proteínas RT, IN, MA e Vpr (7,10).

A integrase do vírus catalisa, então, a inserção do DNA viral no cromossoma da célula hospedeira e é utilizada a maquinaria da célula para a replicação do vírus (10).

3.4. Replicação e Maturação

Então, após o processo de integração, as enzimas do hospedeiro transcrevem o DNA viral gerando mRNA viral, que depois são traduzidos em novas proteínas virais. Estas proteínas, ao serem produzidas, são imaturas e passam a maduras quando são clivadas pela protease viral (7,10). As proteínas virais maduras então, estão prontas para infectar outras células e continuar o seu ciclo de replicação.

Objetivos do trabalho

Após identificar os desafios encontrados nas terapêuticas existentes para o tratamento do HIV, o presente trabalho tem como objetivo conhecer novos fármacos que estão a ser desenvolvidos, com a sua estrutura e mecanismo de acção baseados nos inibidores de entrada, particularmente a enfuvirtida, procurando contornar os problemas da terapêutica com enfuvirtida e otimizar a terapêutica. Este trabalho pretende igualmente saber quais são esses novos inibidores, como funcionam e quais são as suas vantagens relativamente aos convencionais.

Materiais de métodos

A elaboração da presente monografia teve como base análise, interpretação e síntese de vários artigos de revisão, bem como consultas de páginas na internet.

Para o ato de pesquisa foram utilizadas as seguintes palavras-chave: *HIV-1, fusion inhibitors, antirretrovirals, enfuvirtide, lipopeptides*.

As fontes para a obtenção de bibliografia eletrônica foram as plataformas: *Pubmed* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), *Scopus* (<https://www.scopus.com/>), *CDC* (www.cdc.com), *Organização Mundial de Saúde* (www.who.int/en/).

Esta pesquisa foi realizada no período compreendido entre o dia 1 de março de 2019 e o dia 31 de agosto de 2019.

Ela está de acordo com o disposto no Regulamento Interno de Elaboração e Apresentação de Monografias do MICEF 2017 – Regulamento do Estágio Curricular do Curso de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (Diário da República, 2ª série, de 18 de dezembro, regulamento n. 856/2006, regulamentado pela Diretiva 2013/55/EU).

Capítulo II- Antirretrovirais

4. Classificação, função e mecanismos de ação

Os antirretrovirais são medicamentos destinados ao tratamento da infecção pelo HIV e o seu aparecimento contribuiu para um drástico decréscimo nas mortes provocadas pela SIDA (15). O mecanismo de ação dos antirretrovirais relaciona-se com o ciclo de replicação do HIV. Como referido acima, o ciclo de vida do HIV vai desde a fusão e entrada na célula hospedeira, replicação viral, até a montagem e libertação dos novos viriões para fora da célula (15,16). Assim, entre os antirretrovirais que foram sendo desenvolvidos e aprovados, os mais comuns são os inibidores nucleosídicos da transcriptase reversa (INTR) , os inibidores não nucleosídicos da transcriptase reversa (INNTR), os inibidores de transferência de cadeia da integrase (ITI) e os inibidores da protease (IP) (15,16) . Moléculas que inibem a entrada do vírus para dentro das células hospedeiras apareceram depois, sendo alguns destas a enfuvirtide e o maraviroc, ambos aprovados pela FDA (16).

A zidovudina, inibidor nucleosídico da transcriptase reversa, foi o primeiro antirretroviral aprovado pela FDA para o tratamento da infecção pelo HIV (7,15). Os INTRs são

estruturalmente análogos ao DNA e RNA viral, competem com os mesmos na ligação à enzima RT bloqueando a sua ação. Também incorporam-se no DNA viral e atuam como terminadores da síntese da cadeia do DNA pró-viral (15).

Os INNTRs atuam sobre a RT, bloqueando diretamente a sua ação, sendo não competitivos. Ligam-se à enzima num sítio diferente do sítio de ligação do substrato. Induzem alterações conformacionais e rompem o sítio catalítico da RT, bloqueando desta maneira a DNA polimerase (15).

Os IP, tal como o próprio nome indica, inibem a enzima protease do HIV-1, resultando na libertação de partículas virais imaturas e, portanto, não infecciosas (15).

Atualmente, para o tratamento da infeção pelo HIV, estão recomendadas as terapêuticas antirretrovíricas combinadas (TARc). As TARc suprimem significativamente a replicação viral e mantêm a carga viral abaixo dos limites de deteção (< 50 cópias de RNA/ ml) (17). Elas representam um menor risco de surgimento de resistência aos fármacos e de aparecimento de mutações. As TARc têm representado uma grande realização no tratamento da infeção pelo HIV. Há muitos indivíduos seropositivos na sua segunda década de tratamento com uma carga viral abaixo dos limites de deteção (18). A terapêutica é feita por toda a vida sendo que, a sua interrupção leva à uma grande rápida replicação vírica e aumento da carga viral sanguínea (18).

5. Desafios no uso de antirretrovirais

Embora as TARc mantenham as cargas virais suprimidas durante longos períodos, elas não levam a uma cura. O vírus tem a capacidade de se manter em reservatórios, durante longos períodos de tempo, não estando suscetível aos fármacos (7). Mantém-se latente, ficando assim indetetável ao sistema imunitário (2).

O custo dos medicamentos e a não adesão à terapêutica também podem representar problemas no uso dos antirretrovirais, visto que, se não houver a manutenção da terapêutica, ocorre a formação de resistência à medicação (7,18).

Cada vez mais, indivíduos infetados não conseguem ser tratados com inibidores da transcriptase reversa e inibidores da protease, devido ao desenvolvimento de resistência do HIV a esses fármacos. Devido à baixa fidelidade dos inibidores da transcriptase reversa e à alta taxa de replicação do vírus, eventualmente, mesmo a TARc de 3 fármacos, pode falhar numa grande maioria de indivíduos infetados, devido ao surgimento de resistência a esses fármacos (19).

Mesmo em indivíduos com boa aderência à terapêutica, podem surgir mutantes de HIV e resistência (20).

Quase todos os fármacos pertencentes à TARc apresentam toxicidade significativa. Por exemplo, os INTRs podem inibir a polimerase mitocondrial celular e levar à acidose láctica, e os IPs, por diminuírem a atividade de algumas proteínas celulares essenciais, levam à hipercolesterolemia e resistência à insulina (20). Estes efeitos adversos originam a pouca aderência e, portanto, o perigo de surgimento de resistência e falência na inibição do vírus (20). Torna-se, portanto, urgente desenvolver novos fármacos que atuem em outras fases do ciclo de replicação, nomeadamente na entrada do vírus para a célula (3).

Capítulo III- Inibidores de entrada do HIV

Como já vimos, devido à resistência aos fármacos que vai surgindo ao longo do tratamento com TARc, tornou-se necessário pesquisar e desenvolver novos fármacos que atuem em outras fases do ciclo de replicação viral. Quase todos os fármacos aprovados para o tratamento do HIV são pertencentes aos ITR e IP (21). Mas, essas classes têm poucos mecanismos alternativos para se explorar. Assim, fármacos que inibem a etapa de entrada do vírus têm sido intensamente estudados. Essa etapa é, entre todas, se calhar, a mais promissora para se explorar, visto que os inibidores de entrada podem prevenir a transmissão de pessoa para pessoa e podem ser utilizados em profilaxia (16).

Os inibidores de entrada são classificados em três classes: os inibidores de ligação ao recetor CD4, os antagonistas dos corretores CCR5 (Maraviroc) e CXCR4 e os inibidores de fusão (enfuvirtida, T-20 ou *Fuzeon*®). Somente dois agentes, que atuam nas fases de fusão e entrada do vírus para dentro da célula hospedeira se encontram disponíveis no mercado, que são a Enfuvirtida (T-20) e o Maraviroc, respetivamente (14).

6. Inibidores de Fusão: Enfuvirtida ou T-20

A enfuvirtida (T-20) é o primeiro fármaco antirretroviral inibidor de fusão aprovado e o único que se encontra disponível para o tratamento do vírus do HIV-1 (11). Foi identificada na década de 90 e aprovada para uso clínico em 2003 (22).

O T-20 é um péptido produzido sinteticamente, constituído por uma cadeia de 36 aminoácidos (figura 6), cuja estrutura mimetiza o CHR de gp41 do HIV-1 e atua ligando-se ao NHR impedindo a formação da estrutura 6-HB, e assim o vírus não consegue fundir-se à célula alvo (11,14). Inibe seletivamente o HIV-1, não possuindo atividade contra o HIV-2 ou SIV (19). É normalmente utilizado em terapêutica combinada para minimizar o aparecimento de resistência à medicação (11,14). A sua administração é feita por via subcutânea, através de injeções, e a dose para um adulto é de 90 mg duas vezes ao dia e para crianças é de 2 mg/Kg de peso corporal, até um máximo de 90 mg (11). Embora seja o único inibidor de fusão disponível, apresenta inúmeras desvantagens no seu uso; tem baixa atividade antiviral e um tempo de semivida curto, requer que sejam injetadas altas doses e provoca reações no local da injeção, (11,14).

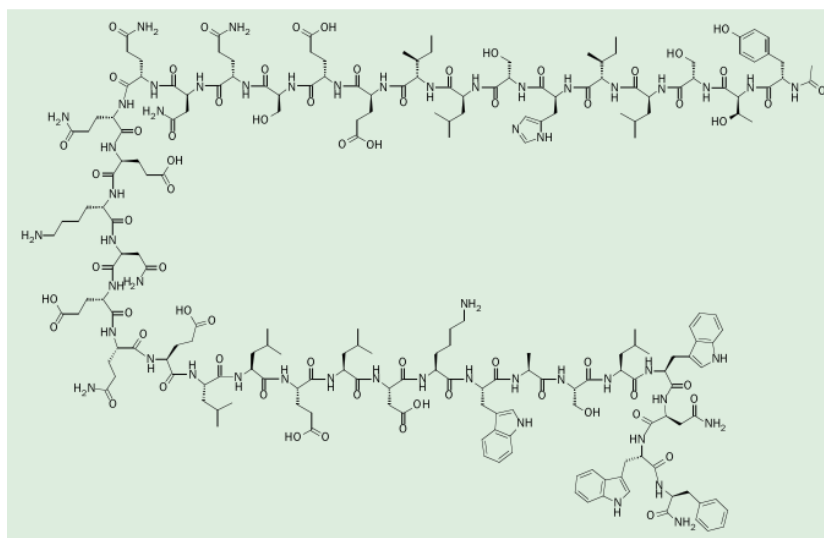


Figura 6. Estrutura molecular da Enfuvirtida. Adaptada de (19)

6.1. Desenvolvimento de péptidos inibidores de Fusão

Em 1990 foi observado que alguns oligopéptidos derivados da gp41, quando incubados com células T humanas, previnem a fusão e a infecção dessas células por HIV-1 (11). O primeiro

desses péptidos a ser caracterizado foi o DP-107, que contém aminoácidos do precursor gp160 do HIV_{LAI}, próximo ao terminal N da gp41 (11). Provou bloquear a fusão e infecção de células mononucleares do plasma pelo vírus. Em algumas experiências realizadas in vitro, DP-107 inibiu a replicação do HIV em concentrações aproximadamente de 5 µg/ml. Mais tarde, em estudos que exploravam péptidos derivados das regiões do terminal C da gp41, foi descoberto um domínio alfa-helicoidal que mostrou ser uma fonte de péptidos antivirais, com muito mais atividade que o DP-107. O mais potente desses péptidos, foi o DP-178 que mais tarde foi renomeado Enfuvirtida (11).

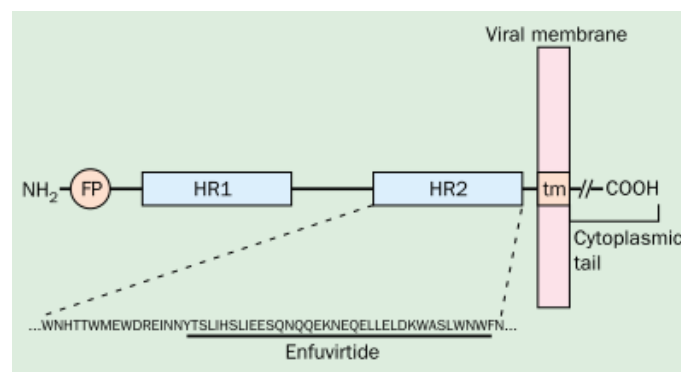


Figura 7. Estrutura esquemática da gp41 do HIV-1. A sequência de aminoácidos de HR2 (CHR) é do HIV-1HXB2 e a sequência de enfuvirtida baseada na HR2 é indicada. Adaptada de (11)

6.2. Mecanismo de ação da Enfuvirtida (T-20)

Durante o processo de fusão, a formação da estrutura 6-HB não ocorre de imediato. Depois que ocorre a inserção do péptido de fusão na célula alvo, o intermediário transitório (pré-harpina) mantém-se por alguns minutos antes da ligação do CHR ao NHR da gp41 do vírus (11). Durante esse período, a gp41 fica vulnerável para inibição por miméticos de CHR, como a enfuvirtida (11). A enfuvirtida forma ligações com o domínio NHR, impedindo que este interaja com o domínio CHR, prevenindo dessa forma a formação da estrutura 6-HB e, consequentemente, a ocorrência de fusão (11).

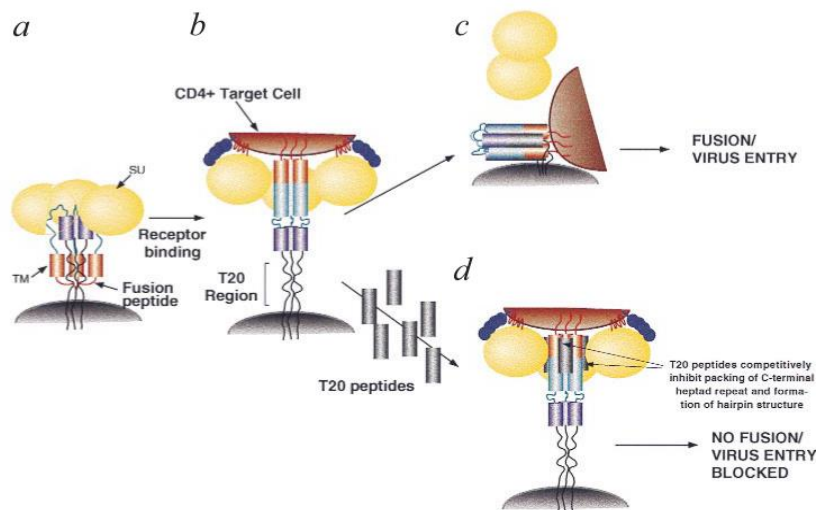


Figura 8. Mecanismo de ação da enfuvirtida. **a**, péptido de fusão na sua posição não exposta e o TM na sua conformação nativa, não fusogênica. **b**, após ligação de gp120 ao CD4, TM muda de conformação e o péptido de fusão é inserido na célula alvo, formando o intermediário pré-harpina. **c**, ocorre a formação da estrutura 6-HB, permitindo a fusão e entrada do vírus. **d**, T-20, quando administrado, liga-se à região conservada hidrofóbica de NHR do TM, que medeia a mudança de conformação do intermediário pré-harpina para o estado ativo de fusão. Previne assim, a fusão e a entrada do vírus. Adaptada de (23)

6.3. Desenvolvimento clínico da Enfuvirtida

Quando se começou a testar a enfuvirtida clinicamente, existiam algumas dúvidas sobre o potencial de péptidos como inibidores de fusão do HIV, só que os estudos pré-clínicos demonstraram uma supressão viral significativa (19). A necessidade foi de testar a enfuvirtida em indivíduos infetados, já tratados com outros fármacos ARVs e que demonstraram resistência a essas terapêuticas. A enfuvirtida demonstrou ser ativa contra os vírus que apresentavam múltiplas resistências aos outros ARVs, provando assim constituir um grande potencial para ser utilizada em estudos em indivíduos infetados pré tratados com outros fármacos que não tiveram sucesso (19).

Devido à falta de biodisponibilidade oral da enfuvirtida, a maioria dos estudos eram focados em estabelecer a forma mais efetiva de administração parentérica e em determinar a eficácia, farmacocinética e dose ótima (11).

Em um estudo de 14 dias (TRI-001) pretendia-se avaliar a dose-resposta da enfuvirtida em monoterapia em 16 indivíduos infetados, por infusão subcutânea, todos os dias (20 minutos a cada 12 horas), em doses de 3, 20, 30 ou 100 mg duas vezes ao dia. O declínio da carga viral mostrou ser dependente da dose, com a mais alta média de redução ($-1.96 \log_{10}$ cópias/mL)

observada no grupo que estava a ser tratado com os 100 mg duas vezes ao dia; além disso, a enfuvirtida mostrou ser bem tolerada, sem existência de descontinuação de dose (11,19,23).

Em outro estudo, na fase II, o perfil de segurança da enfuvirtida com outros regimes terapêuticos em longo termo foi estabelecido, assim como o perfil dose-resposta após 48 semanas de tratamento. Nessa mesma fase, estudos estabeleceram que a enfuvirtida podia ser injetada por via subcutânea e o seu efeito era independente do local de injeção (11,19). Chegou-se à conclusão que, injetada por via subcutânea, providenciava uma farmacocinética mais consistente do que por infusão, e uma maior exposição em termos de meia vida em relação à injeção intravenosa (11).

Em estudos de interação entre fármacos, a enfuvirtida demonstrou ter pouco potencial para afetar ou ser afetada por outros fármacos, visto que, sendo um péptido, é catabolizada em seus aminoácidos constituintes, seguida por retenção e reciclagem desses aminoácidos pelo organismo, sendo esse processo maior que o metabolismo pelo citocromo P450 (19).

O estudo T20-502 demonstrou que não havia nenhuma interação entre a enfuvirtida e 5 outros fármacos, metabolizados pelos CYP1A2, CYP2E1, CYP3A4, CYP2D6 e CYP2C19 em um grupo de 12 indivíduos seropositivos (11,19).

Foram investigados os efeitos que a rifampicina, o ritonavir e ritonavir/saquinavir têm na farmacocinética da enfuvirtida. Esses estudos demonstraram que a enfuvirtida não é afetada substancialmente por nenhum desses fármacos (19).

Os estudos da fase III, sobre a eficácia e segurança da enfuvirtida, conhecidos como TORO (T-20 versus Optimized Regimen Only) foram realizados em indivíduos infetados de diversos lugares do mundo, como Europa, América do Norte, Brasil, México e Austrália. Esses indivíduos já haviam sido tratados anteriormente por outras classes de fármacos antirretrovirais e estavam no mesmo grau de evolução da doença. Um grupo foi submetido a tratamento com antirretrovirais otimizados, de base, selecionados a partir de testes de resistência, sem enfuvirtida, e outro grupo, com esses antirretrovirais mais a enfuvirtida (90 mg, duas vezes ao dia). A redução da carga viral e o aumento do número de linfócitos TCD4+ foi maior nos indivíduos tratados com enfuvirtida. Após 48 semanas, maiores benefícios foram associados com a terapêutica com os antirretrovirais escolhidos, mais a enfuvirtida, como a saúde generalizada, função física e psicológica, entre outros (11,19,24).

6.4. Um caso clínico envolvendo Enfuvirtida

Foi observada, em um indivíduo do sexo feminino de 40 anos, portador de HIV-1, uma recuperação imunitária inesperada, com terapêutica a base de enfuvirtida, após a ocorrência de falência de múltiplos tratamentos (25). Diagnosticado como portadora de HIV-1 em 1990, a primeira contagem de linfócitos CD4⁺ foi de 355 células/mm³. Em outubro de 1998, a contagem de células CD4⁺ foi de 5 células/mm³ (25). Em abril de 1999, a sua infecção progrediu para SIDA, quando teve retinite por citomegalovírus (CMV) e uma série de infecções oportunistas até agosto de 2001, em que teve retinite e esofagite por CMV, esofagite por candidíase e infecção disseminada por micobactérias (25). Desde o seu diagnóstico até então, o indivíduo atrás referido tinha recebido vários tratamentos com antirretrovirais, que incluíam fármacos como INTRs, INNTRs e IPs, mas que apenas levaram a uma pequena e transitória melhoria na contagem das células CD4⁺, sem conseguirem controlar a carga viral. A seguir, após um teste de resistência genotípica, foi começado um regime à base de tipranavir/ritonavir, lamivudina e enfuvirtida, que levou a um decréscimo da carga viral de 1.76 log₁₀, por aproximadamente dois anos, com uma virémia flutuante (25). Apesar de boa aderência, nunca chegou a alcançar níveis indetectáveis, mas, houve um aumento significativo na recuperação do sistema imunitário, o número de linfócitos TCD4⁺ passou de 16 a 922 células/mm³ (25). A razão CD4⁺/CD8⁺ passou de 0,13 para 1,07. Somente um caso foi reportado como um evento decorrente da infecção por HIV, que foi uma candidíase oral (25).

Em novembro de 2004, devido à fadiga e reações nos locais de injeção de enfuvirtida, a portadora pediu que a TARc fosse interrompida, e como tal, nos 18 meses que se seguiram, a carga viral aumentou, acompanhada de um decréscimo nos valores de células T CD4⁺ (de 733 para 365 células/mm³) (25). Mesmo assim, manteve um bom estado clínico e uma boa qualidade de vida, sem a ocorrência de nenhuma doença associada ao HIV (25).

Em abril de 2006, foi reintroduzido, devido ao declínio progressivo de células CD4⁺, um tratamento com lopinavir/ritonavir, efavirenz e lamivudina. Após 2 meses, foi adicionada a enfuvirtida e, após 1 mês, outro aumento significativo de células CD4⁺ (409 para 928 células/mm³) foi observado (25). Um tempo depois, o indivíduo desistiu do tratamento com enfuvirtida devido às reações no local de injeção (25).

Melhorias similares no sistema imunitário foram observadas em outros indivíduos infectados tratados com TARc contendo enfuvirtida (25).

Os estudos que foram efetuados concluíram que somente a eficácia dos TARc não é o único mecanismo que explica a melhoria no sistema imunitário da doente (25).

A replicação viral está relacionada com o fenótipo do vírus, o que influencia na progressão da doença. O vírus da doente mostrou tropismo para o correceptor CCR5, durante o período de tratamento com TARc com ou sem enfuvirtida mas, após a interrupção do tratamento, o vírus mostrou ter tropismo duplo (para CXCR4 e CCR5). Após retomar o tratamento de TARc com enfuvirtida, o vírus voltou a ter somente o tropismo para CCR5, sugerindo que a TARc e, possivelmente, a enfuvirtida têm importância no controle dos vírus com tropismo para CXCR4, o que pode ter contribuído para a restauração da contagem de células CD4+ (25). O mesmo foi observado em outro estudo, com outros indivíduos infetados, envolvendo a enfuvirtida (25).

Fatores inerentes ao hospedeiro, como a resposta do anticorpo neutralizador (Nab), também mostraram contribuir para o controle do vírus e restauração das células CD4+. O anticorpo, mostrou resposta contra vírus com tropismo para CCR5 e um pouco de resposta para vírus com tropismo para CXCR4, sugerindo que a recuperação significativa obtida durante o tratamento com TARc e enfuvirtida levou a uma restauração do sistema imunitário com benefícios observados durante todo o período de tratamento (25).

Para os investigadores, este foi o primeiro caso de uma melhoria significativa no sistema imunitário observado em um indivíduo infetado, com um histórico de 16 anos com infecção por HIV-1 e progressão para SIDA e com um vírus resistente a múltiplos fármacos (25). A melhoria continuou mesmo após a interrupção do tratamento com TARc, talvez devido às respostas do Nab, que provou que a doente tinha um sistema imunitário bem funcional (25).

Apesar da persistência da carga viral, a associação do tratamento com enfuvirtida e o aumento significativo das células CD4+ devem ser consideradas excepcionais em indivíduos infetados que têm múltiplas falências terapêuticas e uma infecção bastante avançada por HIV-1. O tratamento com Enfuvirtida pode levar a uma restauração de sistema imunitário funcional, como demonstrado pela resposta do Nab (25).

Este caso demonstrou que os clínicos devem ser desafiados a investigar o potencial benefício da enfuvirtida para o sistema imunitário, em indivíduos infetados com SIDA e vírus com múltipla resistência a outros fármacos (25).

7. Desenvolvimento de novos inibidores de entrada do HIV

A enfuvirtida representou um grande avanço na época em que foi descoberta, sendo o primeiro antirretroviral inibidor de fusão aprovado e utilizado, com um mecanismo de ação único, grande eficácia e pouca toxicidade (20). Mostrou igualmente ter uma grande eficácia contra um largo espectro de estirpes de HIV-1 (24). Porém, apresenta desvantagens no seu uso. Como já vimos, devido à sua falta de biodisponibilidade oral, só pode ser administrada por via parentérica, requer altas doses (90 mg, duas vezes por dia), tem um curto tempo de meia vida (aproximadamente 4h), provoca reações adversas no local de injeção e pode induzir resistência do vírus ao fármaco (14,22,26).

Além das desvantagens apontadas, o sucesso clínico da enfuvirtida estimulou que os mecanismos de fusão e inibição viral fossem mais pesquisados e que muitas variantes da mesma fossem sendo estudadas, representando as próximas gerações de inibidores de fusão com propriedades farmacológicas otimizadas (26).

7.1. Inibidores de fusão de segunda e terceira geração

As variantes de T-20 que foram aparecendo eram baseadas também nas sequências de gp41 de isolados de HIV, mas com algumas variações nos subdomínios de CHR (HR2) (27). Por exemplo, o protótipo de segunda geração, T1249 (tifuvirtida), é maior que o T-20 e apresentou maior potência nos estudos in vitro, quando comparado ao T-20 (27,28). O T1249 é um péptido constituído por 39 aminoácidos de sequências de aminoácidos provenientes de HIV-1, HIV-2 e SIV (28). Mostrou ser bem tolerado em humanos com doses de 192 mg/dia, causando reações adversas moderadas, no local de injeção, e com um decréscimo na carga viral igual obtido com a maioria dos fármacos inibidores de HIV-1 mais potentes. Importante mencionar que variantes do vírus que mostraram ser resistentes às terapêuticas envolvendo o T-20 não mostraram resistência ao T1249 (27,28).

No terminal C do T-20, há um motivo de 8 aminoácidos ricos em triptofano (TRM), que é um domínio de ligação a lípidos que atua ancorando o inibidor à membrana celular, porém falta-lhe o PBD, que tem um papel crítico na interação entre NHR e CHR. T1249 incorpora ambos os domínios, mas foi descontinuado devido à problemas de formulação (22,28).

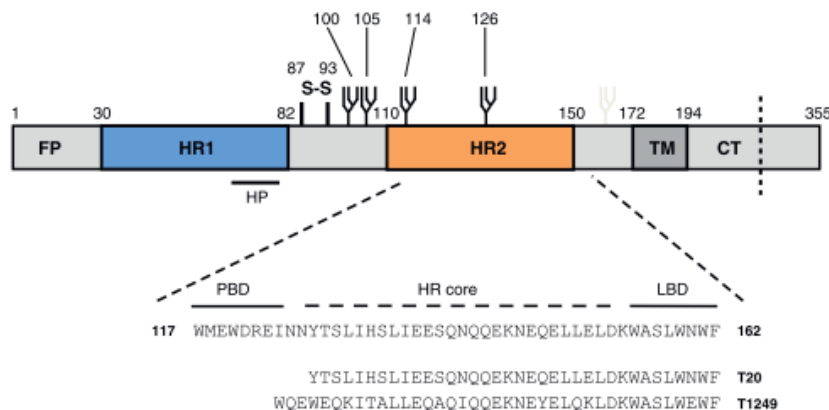


Figura 9. Representação esquemática dos subdomínios de gp41 e dos inibidores de fusão baseados em HR2 (T20 e T1249). Adaptado de (27)

Em solução, T-20 e T1249 são mais suscetíveis à proteases séricas, devido à sua estrutura enrolada (27). A falta de estrutura secundária afeta a eficácia porque a ligação ao NHR exige que os inibidores baseados no CHR adotem uma estrutura α -helicoidal. Então, quando foram desenvolvidos os inibidores de terceira geração, como a sifuvirtida, o Cp32M e o T2635, a estrutura helicoidal foi melhorada, após a incorporação de pontes de sal entre as hélices, em cada volta helicoidal. Com o aumento da conformação helicítica desses novos inibidores, ocorreu o aumento da estabilidade térmica, tempo de meia vida e potência contra o vírus (27). Além disso, eram ativos contra as variantes dos vírus que se mostraram resistentes aos inibidores de primeira e segunda geração (27). Esses compostos, assim como outros, foram sendo desenvolvidos com a sua estrutura baseada no péptido C34, que é também, junto com a enfuvirtida, um péptido de primeira geração (24). Diferente da enfuvirtida, o C34 contém a região PBD, inibindo a fusão do HIV-1, in vitro, com maior eficácia que T-20. Porém, devido aos seus problemas de solubilidade, existe menos interesse em seu desenvolvimento clínico (24). É bastante utilizado como um modelo para desenvolver outros inibidores de fusão (24).

Após os péptidos de segunda geração mencionados acima, foram desenvolvidos os péptidos de terceira geração. São péptidos modificados que incluem os péptidos contendo o gancho M-T e lipopéptidos (29).

O C34-Chol, derivado do C34 por conjugação de um grupo de colesterol ao seu terminal C, mostrou um grande potencial antiviral in vitro e um grande tempo de meia vida (14,21). Tem maior potência antiviral que T-20 e T1249 (21). Estudos demonstraram que conjugar um lípido (ácido gordo, colesterol, esfingolípido) a um péptido era a forma mais eficiente de se

desenvolverem péptidos inibidores de fusão (14,21). O colesterol demonstrou ser importante para ancorar e estabilizar um péptido na camada lipídica viral (21).

A descoberta do gancho M-T forneceu uma estratégia adicional para melhorar as características dos inibidores (26). O gancho M-T consiste em dois resíduos (Met115 e Thr116) precedentes ao PBD dos péptidos baseados em CHR de gp41, que adotam uma estrutura única em forma de gancho. Este melhora muito a ligação do CHR ao sítio hidrofóbico do NHR, aumentando muito a atividade de pequenos péptidos, que seriam inativos de outra forma (30,31). A partir do gancho M-T foram desenvolvidos dois péptidos, HP23 e 2P23, que mostraram maior eficácia antiviral que os péptidos baseados em C34, exibiram maior poder de inibir os mutantes de HIV-1 resistentes à enfuvirtida e uma grande barreira genética ao desenvolvimento de resistência (26).

Conhecendo a potente atividade antiviral de péptidos conjugados com lípidos, HP23 foi modificado com diferentes classes de lípidos, resultando em um painel de lipopéptidos, sendo um deles o LP-11, que apresentava um grande aumento de atividade na inibição de subtipos de HIV-1 e mutantes resistentes à enfuvirtida (26). Com o objetivo de desenvolver um inibidor de fusão ainda mais potente, foi originado o LP-19, ao se conjugar o 2P23 com lípidos (C16), que em monoterapia reduziu a carga viral para níveis indetectáveis em testes feitos em *Macacus rhesus* infectados, tanto em infecção aguda como em infecção crônica por HIV-1, HIV-2 e SIV (14,26,31). Ao se examinar a estrutura secundária e estabilidade de LP-19 este mostrou ter alta conformação α - helicítica e alta estabilidade, e a sua temperatura de fusão não foi encontrada, o que indica alta estabilidade na sua estrutura (31). LP-19 também mostrou ser ativo contra mutantes resistentes e isolados primários de HIV (31).

7.1.1. Desenvolvimento dos lipopéptidos LP-40 e LP-46

A mesma equipa que desenvolveu LP-11 e LP-19, também desenvolveu LP-40 e LP-46 (29).

Como é conhecido, o TRM do T-20 tem um papel muito importante na sua atividade inibitória. Para explorar o papel do TRM, foi criado um lipopéptido baseado no T-20 ao se substituir o TRM por um ácido gordo C16 (ácido palmítico). Este lipopéptido foi nomeado LP-40 (demonstrado na figura 10) e, surpreendentemente, mostrou ter atividade inibitória de fusão

aumentada. Ao contrário dos péptidos baseados em HP23, a introdução de um linker inibiu a sua atividade, sugerindo dessa forma, diferentes tipos de ligação ao NHR de gp41 (26). Enquanto um lipopéptido, para se ligar ao sítio de ligação do NHR, necessita de um linker longo, um lipopéptido, com a sua estrutura baseada em T-20, não necessita de um linker.

LP-40 demonstrou em ensaios de fusão viral, com o HIV-1 HXB2, possuir atividade antiviral maior que T-20. Comparado ao T-20, a sua concentração inibitória média de 50% (IC₅₀) foi de 0,41 nM, enquanto que T-20 mostrou ter um IC₅₀ de 24,17 nM, que indica um aumento da potência de LP-40 em 58.95 vezes (26). Em ensaios de citotoxicidade, ambos T-20 e LP-40 tiveram uma concentração citotóxica em 50% (CC₅₀) maior que 100 µM, levando à conclusão que tinham uma elevada seletividade terapêutica (26).

LP-40 demonstrou aumentar a afinidade de ligação ao alvo. Quando foi aplicada espectroscopia DC para verificar a sua interação com o NHR do péptido N39 em comparação ao péptido DP-C16, um lipopéptido previamente reportado, a sua interação helicoidal e temperatura de fusão foi de 60,9% e 51,3°C, respetivamente, enquanto que para o DP-C16, os valores foram de 53,9% e 43°C. Concluiu-se que substituir o TRM por um ácido gordo aumenta a ligação e atividade inibitória para T20.

Investigou-se a atividade inibitória de LP-40 contra alguns pseudovírus resistentes à enfuvirtida e sua atividade foi comparada com a dos inibidores HP23 e LP-11, como mostrado a seguir na tabela 1 (em anexo). Quando comparado ao T-20, o LP-40 inibiu três dos vírus (WT, D36G e I37T) com atividade aumentada, mas, contra a maioria dos mutantes, mostrou nenhuma ou pouca melhoria na atividade inibitória. Ao contrário de LP-40, HP23 e LP-11 mantiveram elevada potência, como mostrado em estudos anteriores (26). Nos mutantes resistentes à HP23 e LP-11, LP-40 mostrou elevada potência de inibição, com um IC₅₀ de 1,12 nM e 1,41 nM, indicando um aumento de potência de cerca de 30 vezes em relação aos outros péptidos. Estes resultados sugerem um efeito sinérgico entre LP-11 e LP-40 no tratamento da infeção por HIV-1 (26).

Tabela 1. Inibição de mutantes de HIV-1 resistentes à medicação, utilizando LP-40, HP23 e LP-11. Adaptado de (26)

NL4-3	Inhibition (IC ₅₀ [nM]) (mean ± SD)			
	T20	LP-40	HP23	LP-11
T20 sensitive				
D36G	10.6 ± 3.07	0.72 ± 0.2	0.85 ± 0.04	0.36 ± 0.06
T20 resistant				
WT	109.7 ± 39.73	39.42 ± 7.02	0.69 ± 0.2	0.29 ± 0.1
I37T	932.12 ± 98.89	334.42 ± 89.39	0.79 ± 0.03	0.45 ± 0.19
V38A	2,318.17 ± 167.32	1,644.42 ± 212.88	0.65 ± 0.17	0.26 ± 0.09
V38 M	1,097.47 ± 194.59	732.49 ± 231.62	1.03 ± 0.08	0.43 ± 0.07
Q40H	1,152.53 ± 241.02	1,366.83 ± 415.38	0.85 ± 0.16	0.24 ± 0.06
N43K	621.85 ± 200.95	409.17 ± 142.05	0.68 ± 0.18	0.32 ± 0.13
N126K	181.41 ± 46.43	381.97 ± 15.93	1.89 ± 0.24	0.75 ± 0.17
D36S/V38 M	444.93 ± 204.65	405.86 ± 212.05	1.11 ± 0.57	0.63 ± 0.22
I37T/N43K	>2,000	>1,500	0.82 ± 0.03	0.33 ± 0.1
V38A/N42T	>2,000	>1,500	0.44 ± 0.04	0.12 ± 0.04
HP23 resistant				
L57R	19.57 ± 2.83	1.12 ± 0.39	243.5 ± 36.73	8.74 ± 5.15
L57R/E136G	12.65 ± 2.09	1.41 ± 0.15	>430	20.13 ± 6.54

Embora LP-40 mostrasse ser potente, não apresentava nenhuma melhoria apreciável no tratamento de mutantes resistentes ao T-20 e isolados de HIV-2 (28), pelo que se tornou necessário investigar outros péptidos que tivessem essa vantagem sobre LP-40.

Foi feito um estudo, após o desenvolvimento de LP-40, com o objetivo de se desenvolver um inibidor mais potente e o T1249 foi utilizado como estrutura base (28). Ao se substituir o seu TRM por um ácido gordo (C16), originou-se um novo lipopéptido designado LP-46 (demonstrado na figura 10) (28). Este lipopéptido mostrou potente atividade em inibir HIV-1, HIV-2, SIV e mutantes resistentes ao T-20, e também demonstrou possuir efeitos sinérgicos com LP-40 (28). Ao se comparar a atividade de LP-46 e T1249, usando T-20 e LP-40 como controlo, LP-46 revelou ter o menor IC₅₀ ao inibir a entrada do pseudovírus NL4-3 (28).

Quando a citotoxicidade de T1249 e LP-46 foi determinada, ambos revelaram uma concentração citotóxica de 50% (CC₅₀) maior que 140 µM, mostrando ter seletividade terapêutica (28).

Ao contrário de LP-40, T1249 e LP-46 mostraram serem potentes inibidores contra mutantes resistentes à enfuvirtida, sendo que LP-46 mostrou ter maior atividade inibitória dos mutantes que o T1249 (28).

LP-46 mostrou ser muito mais eficiente em inibir isolados de HIV-2 e SIV. Comparado com T-20, LP-40 não mostrou ter maior ou menor atividade contra isolados de SIV e HIV-2, mas LP-46 mostrou possuir elevada atividade (28).

Ensaios em que se fez a combinação de LP-40 com LP-46 resultaram em um sinergismo num painel de pseudovírus com diferentes subtipos e fenótipos, revelando um efeito sinérgico na inibição da entrada do vírus e na fusão (28).

Ao se tentar entender as propriedades estruturais e o mecanismo de ação, a estrutura secundária e a termoestabilidade de T1249 e LP-46 foram analisadas, na presença e na ausência de péptidos miméticos do local alvo (N44). Ambos os isolados mostraram possuir características α -helicoidais e LP-46 mostrou ser mais estável que T1249, ao se avaliar as suas temperaturas de fusão (28). Depois, as interações de T1249, LP-46 e LP-40 com N44 foram comparadas e descobriu-se que os complexos formados de LP-40 e LP-46 com N44 revelaram elevada conformação α -helicítica e termoestabilidade, comparada com o complexo formado entre N44 e T1249. N44/LP-46 apresentou uma estrutura helicoidal de 89,62% e uma T_m de 87,09 °C, N44/LP-40 mostrou uma estrutura helicoidal de 83,81% e uma T_m de 81,1 °C e N44/T1249 mostrou uma estrutura helicoidal de 74,99% e uma T_m de 78,05 °C (28).

Em estudos de cristalografia do complexo formado entre LP-46 e N44, estes demonstraram formar a conformação 6-HB típica. Ao contrário do que se esperava, o PBD do LP-46 não se ligou ao bolso hidrofóbico de NHR, mas alinhou-se à sequência NHR contínua pelo terminal C do inibidor. A forma de ligação de LP-46 ao N44 demonstrou ser semelhante à de LP-40.

7.1.2. Desenvolvimento dos lipopéptidos LP-50 e LP-51

Após os estudos sobre o LP-40, a sua estrutura foi refinada e, assim, dois novos lipopéptidos foram desenvolvidos, o LP-50 e o LP-51 (14). Ambos os inibidores mostraram ter elevada potência em inibir o HIV-1, o HIV-2, o SIV e mutantes resistentes à enfuvirtida em estudos efetuados em *Macacus rhesus* (14). Em monoterapia e doses baixas, esses inibidores diminuíram a carga viral para níveis indetectáveis nos macacos, mostrando serem promissores para tratamento de infecção por HIV-1, HIV-2 e SIV (14).

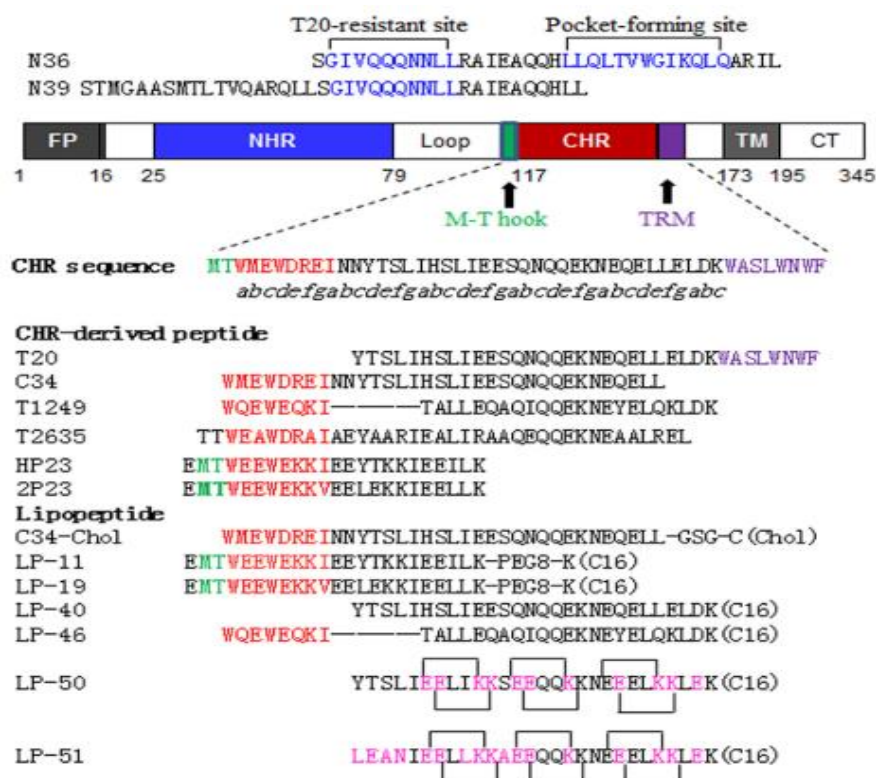


Figura 10. Caracterização esquemática de HIV-1 e peptídeos baseados em CHR e NHR de gp41. As posições e sequências correspondentes ao sítio resistente a T20 e lugar de ligação ao NHR são mostrados a azul. As letras em itálico “*abcdefg*” correspondem às posições de aminoácidos por cada sequência de sete peptídeos. As posições e sequências correspondentes ao gancho M-T, PBD e TRM do CHR estão marcadas a verde, vermelho e roxo, respectivamente. (Chol) representa colesterol e (C16) representa ácido palmítico. Resíduos de LP-50 e LP-51 são marcados com rosa e pontes salinas estão indicadas em linhas pretas. Adaptado de (14)

Para a síntese de LP-50, introduziram-se múltiplos pares de ácido glutâmico e resíduos de lisina (motivos EK) nos locais acessíveis a solvente (*b,c* e *f,g*) de LP-40, com isso, levando com isso a formação de pontes salinas intrahelicais por cada volta helicoidal. Já LP-51 foi produzido após introdução de aminoácidos de sequências de HIV-2 e SIV nos locais de ligação ao NHR (locais *a,d,e*).

Estes novos inibidores, em solução, possuem uma conformação α -helicoidal e um grande aumento da termoestabilidade, como mostrado na figura 12. Quando analisadas as interações com N39, peptído mimético derivado de NHR, todos os inibidores interagiram com o peptído formando estruturas α -helicoidais. LP-50 e LP-51 tiveram valores de T_m de 63°C e 72°C, muito maiores que os valores de T_m de T-20 e LP-40, que foram de 44°C e 51°C, respectivamente (14).

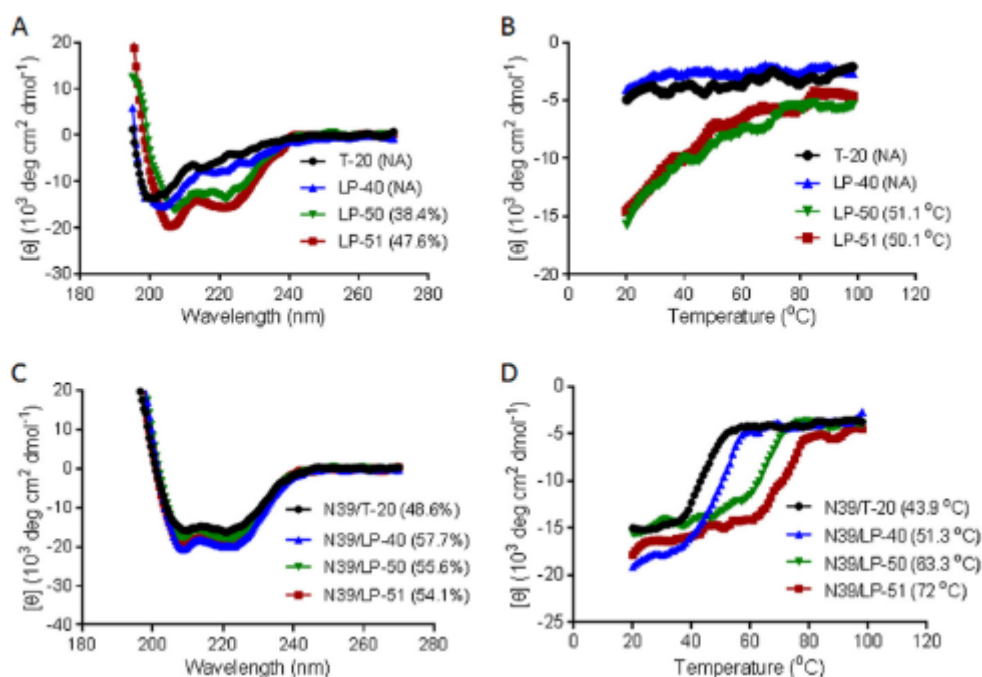


Figura 11. Propriedades dos novos inibidores determinadas por espectroscopia DC. A e B representam a estrutura secundária e termostabilidade dos inibidores isolados numa concentração de 10 μ M em PBS. C e D representam a estrutura secundária dos inibidores na presença do péptido N39, derivado de NHR, numa concentração de 10 μ M em PBS. Em parênteses estão os valores de conteúdos de estruturas α -helicoidais e T_m . Adaptado de (14)

Em ensaios que pretendiam determinar a atividade de LP-50 e LP-51 contra isolados de HIV-1, os valores de IC_{50} para ambos eram de 35 e 25 pM, respetivamente, valores muito menores do que os IC_{50} de T-20 e LP-40. Estes resultados foram obtidos ao se utilizar um painel de partes de HIV-1 com diferentes fenótipos. Quando construído um painel de HIV-1 representando a epidemia global de SIDA, LP-50 e LP-51 inibiram os subtipos de HIV-1 com IC_{50} de 22 e 26 pM, enquanto que os valores para T20 e LP-40 eram de 36.020 e 5.994 pM respetivamente (14).

Outra grande propriedade de LP-50 e LP-51 é a de serem potentes inibidores de mutantes de HIV-1, HIV-2 e SIV, resistentes ao T-20. LP-51 mostrou ter maior potência de inibição que LP-50, como mostrado para os mutantes V38A, N43K, I37T/N43K e V38A/N42T. Embora os valores de IC_{50} de LP-50 e LP-51 fossem significativamente maiores para os mutantes do que para os *wild-type* (WT) e vírus T-20-sensitivo (D36G) e que os mutantes resistentes ao T-20 pudessem conferir resistência, ambos os inibidores mostraram conseguir sustentar a sua atividade inibitória em concentrações nanomolares ou subnanomolares (Tabela 2).

Tabela 2. atividade inibitória de lipopéptidos inibidores de fusão contra mutantes resistentes ao T20 de HIV-1, isolados de HIV-2 e isolados de SIV. Adaptado de (14)

Env	Mean IC ₅₀ (nM) ± SD			
	T-20	LP-40	LP-50	LP-51
T-20 sensitive: NL4-3 _{D36G}	13.65 ± 0.48	0.61 ± 0.07	<0.01	<0.01
T-20 resistant				
NL4-3 _{WT}	152.23 ± 15.28	43.94 ± 12.29	0.08 ± 0.02	0.03 ± 0
NL4-3 _{I37T}	1,001.19 ± 55.94	349.57 ± 95.56	1.07 ± 0.16	0.59 ± 0.04
NL4-3 _{V38A}	2,780 ± 176.55	1,812.67 ± 496.51	6.53 ± 0.37	1.77 ± 0.24
NL4-3 _{V38M}	1,319.73 ± 33.1	2,747 ± 758.5	1.45 ± 0.47	0.4 ± 0.19
NL4-3 _{Q40H}	2,147.37 ± 447.3	1,293.5 ± 364.83	3.76 ± 0.66	0.58 ± 0.05
NL4-3 _{N43K}	729.12 ± 79.37	534.77 ± 169.81	5.87 ± 0.73	0.99 ± 0.14
NL4-3 _{G36S/V38M}	565.17 ± 57.28	604.52 ± 142.66	1.76 ± 0.08	0.38 ± 0.06
NL4-3 _{I37T/N43K}	>4,200	3,296 ± 260.62	142.03 ± 166.5	13.11 ± 1.08
NL4-3 _{V38A/N42T}	2,756 ± 831.37	1,745.13 ± 84.18	60.32 ± 7.89	8.3 ± 0.88
NL4-3 _{E49K/N126K}	470.97 ± 34.19	648.93 ± 21.12	0.16 ± 0.03	0.1 ± 0.03
HIV-2 or SIV				
HIV-2 _{ROD}	496.73 ± 14.53	1,582.33 ± 271.65	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.02
HIV-2 _{ST}	1,395.44 ± 429.91	>5,000	7.01 ± 0.75	1.7 ± 0.13
SIV ₂₃₉	353.13 ± 18.6	435.33 ± 19.6	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01
SIV _{PBJ}	939.83 ± 125.77	1,695.33 ± 265.44	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.01
SHIV				
SHIV _{SF162P3}	4.94 ± 0.65	1.23 ± 0.15	0.07 ± 0	0.09 ± 0
SHIV ₁₁₅₇	11.48 ± 1.31	23.68 ± 4.7	0.04 ± 0	0.04 ± 0.01
Control Env: VSV	>2,000	>2,000	>2,000	>2,000

Em seguida, foram verificadas as estabilidades e atividades antivirais *in vivo* de LP-40, LP-50 e LP-51 em *macacus rhesus*. LP-40 atingiu, após 4h de administração, um mais baixo nível sérico, que foi parecido ao do T-20. Já por outro lado, LP-50 e LP-51 tinham altos níveis séricos após 4h de administração e as atividades inibitórias persistiram até 72h após injeção, enquanto que, para T-20 e LP-40, nas 6h após administração já não se detetava atividade antiviral sérica. LP-50 apresentava uma diluição sérica, após 48h, de 10.549 vezes e de 182 vezes após 72h, LP-51 apresentava uma diluição sérica, após 48h, de 34.481 vezes e de 1.122 vezes após 72h. Estes resultados provaram que os lipopéptidos LP-50 e LP-51 têm alta potência e longa atividade antiviral *in vivo* (14).

A eficácia de LP-51 na infecção crônica por SHIV foi avaliada ao se começar um experimento em um macaco *M. rhesus* (J0) com infecção crônica por SHIV_{SF162P3}, com uma carga viral muito alta, de 6,47 log₁₀ cópias/ml de RNA. O macaco foi tratado por via subcutânea com LP-51 numa dose de 3 mg/kg de peso corporal, uma vez por dia, durante quatro semanas. Após sete dias do início do tratamento, a carga viral plasmática estava abaixo do limite de detecção. Durante o tratamento, a carga viral permaneceu sempre indetetável, mas aumentou após sete dias depois do tratamento ser interrompido. Passados 30 dias, o tratamento com LP-51 foi retornado, com a mesma dosagem de antes, e a carga viral que era de 7,51 log₁₀ cópias/ml

de RNA declinou para níveis indetetáveis após 21 dias de tratamento. Este foi depois cessado e a carga viral tornou a aumentar. Decorridos 90 dias, um terceiro tratamento com LP-51 foi começado, dessa vez com uma dosagem reduzida, de 1mg/kg de peso corporal, uma vez por dia, durante 4 semanas. A carga viral mais uma vez declinou para níveis indetetáveis depois de um tratamento de 14 dias e, após o cessamento, a eficácia continuou retida passados 14 dias. Para validar a eficácia de LP-51, outros macacos com infecção crónica por SHIV (J1, J2, J3, J4 e J5) também foram tratados com LP-51, com uma dosagem de 1 mg/kg de peso corporal, uma vez por dia, durante 4 semanas, e as cargas virais que antes eram elevadas, declinaram para níveis indetetáveis em poucos dias de tratamento (14).

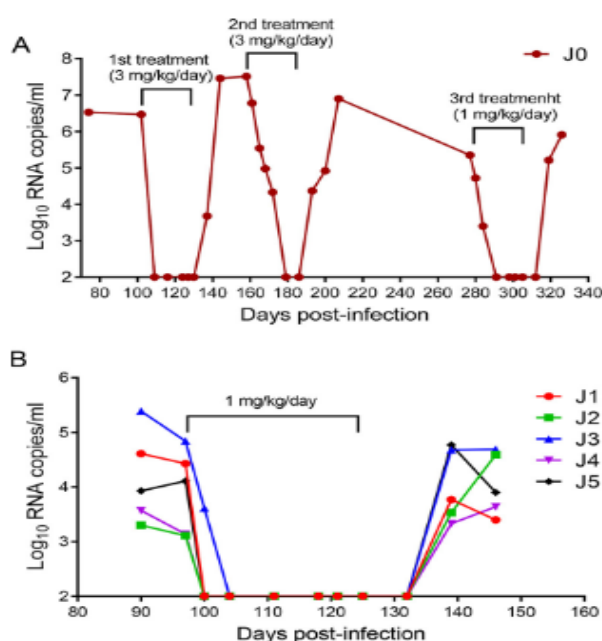
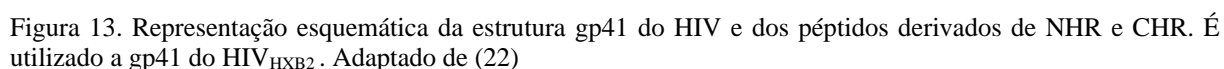


Figura 12. Eficácia terapêutica de LP-51 em macacos rhesus infetados por SHIV. (A) Períodos de tratamento e cessação do tratamento em J0 e respetivas cargas virais. Doses de LP-51 em cada tratamento. (B) outros modelos de macacos, também com infecção crónica, tratados com LP-51 em dose de 1 mg/kg, uma vez por dia. Cargas virais correspondentes aos períodos sem e com tratamento. Adaptada de (14).

7.1.3. Desenvolvimento de LP-52

Após o desenvolvimento de LP-50 e LP-51 por refinação da estrutura de LP-40, LP-51 foi otimizado por substituição dos seus três resíduos N- terminais, com os correspondentes resíduos terminais de LP-46, gerando, assim, um novo inibidor, o LP-52, como mostrado na figura 13 (22).



Ao se determinar a estrutura cristalina de LP-52 por espectroscopia DC, viu-se que apresentava uma conformação α -helicoidal semelhante ao LP-51, mas a sua termoestabilidade era muito maior. Quando se determinou a termoestabilidade de LP-51 e LP-52 na presença de um péptido mimético de NHR (N39), verificou-se que o complexo LP-51/N39 tinha um valor de conformações α -helicoidais de 54% e uma temperatura de fusão de 72°C, enquanto que o complexo LP-52/N39 tinha um valor de conformações α -helicíticas de 64% e uma temperatura de fusão de 79°C. Ao se investigar a atividade inibitória de LP-52, este mostrou inibir com mais eficácia a fusão celular mediada por envelope de HIV-1_{HXB2} e a entrada celular mediada pelo pseudovírus HIV-1NL4-3 com IC₅₀ de 13 e 4 pM, respetivamente. LP-52 conseguiu inibir um painel de cepas de HIV-1 em replicação, com um IC₅₀ de 9 pM, enquanto que o valor de IC₅₀ para LP-51 era de 29 pM e de T-20 era de 15 141 pM. Com esses resultados, provou-se que a otimização das sequências aumenta substancialmente a estabilidade de ligação e atividade antiviral dos inibidores (22).

A seguir, ao estudar a relação estrutura-atividade (SAR) dos novos inibidores, verificou-se que a deleção dos três resíduos C-terminais, LEK (figura 15, LP-55), diminui

significativamente a capacidade de ligação e atividade inibitória de LP-40 e LP-50, e no LP-52 também diminui a capacidade de ligação, como demonstrado pela diminuição da T_m (que desceu para 63°C), mas não exerce nenhum efeito na atividade inibitória. Verificou-se que com a deleção do motivo WEQK do N-terminal e a deleção do motivo LEK do C-terminal de LP-52, originando o lipopéptido designado por LP-69, com apenas 21 resíduos, ainda continua a ter alta atividade inibitória e capacidade de ligação, ou seja, é uma sequência que criticamente determina a estabilidade de ligação e atividade inibitória dos derivados de T-20 (22).

Também houve um interesse em verificar se o PBD é essencial para os lipopéptidos baseados em T-20. Assim, um painel de lipopéptidos, foram desenhados com o PBD e sem o PBD, e aqueles que continham um PBD completo, como LP-74, ou um PBD completo e o gancho M-T, como LP-75, exibiram reduzida atividade em inibir a fusão do vírus, entrada e infecção. Ao se determinar a capacidade de ligação e atividade inibitória de inibidores que se ligam especificamente ao domínio *pocket* de gp41, como LP-11, LP-19 e LP-46, verificou-se que apresentavam alta estabilidade na ligação mas uma relativa atividade antiviral. Ao se deletar uma parte de resíduos (WEQ) do PBD de LP-46, a capacidade de ligação diminuiu mas a atividade inibitória não sofreu alterações. Os lipopéptidos baseados em C34, como C34-16 e C34-Chol, que contêm o PBD demonstraram possuir atividade reduzida quando comparados com LP-50, LP-51, LP-52 e as versões truncadas de LP-52 (LP-55 e LP-65). Todos esses resultados servem para demonstrar que o PBD não é essencial para os novos lipopéptidos, baseados em T-20 (22).

Com o interesse de verificar a atividade de LP-52 e das suas versões truncadas, foram construídos pseudovírus sensíveis e resistentes ao T-20, em um ensaio de infecção. LP-52, mostrou possuir melhorias em inibir um painel de mutantes resistentes à enfuvirtida, quando comparado com os lipopéptidos LP-50 e LP-51. Contrariamente, as versões truncadas de LP-52 (LP-55, LP-64 e LP-65) tiveram uma brusca diminuição na inibição dos vírus resistentes ao T-20 (22).

LP-52, além de inibir o HIV-1, também inibiu com alta potência isolados de HIV-2 e SIV. As versões truncadas LP-55 e LP-69 mostraram diminuída atividade em inibir isolados de HIV-2 e SIV, mas LP-64 e LP-65 demonstraram atividades semelhantes as do LP-52. Esses resultados demonstraram que o motivo LEK do terminal-C é fundamental para determinar a atividade de LP-52 na inibição de isolados de HIV-2 e SIV (22).

O LP-52 destacou-se também em ensaios em que se pretendia determinar a sua capacidade de ligação com a membrana da célula alvo. LP-52 e outros inibidores como T-20, C34, 2P23, foram incubados com células TZM-bl, seguidos pela lavagem e adição do vírus. Depois, foram examinadas as atividades inibitórias dos inibidores que sobreviveram à fase de lavagem e constatou-se que, enquanto que os outros inibidores diminuíram drasticamente a sua atividade após lavagem, LP-52 reteu a eficácia totalmente, mesmo depois de infecção ocorrida após lavagens durante 24h (22).

Também se descobriu, por ensaios adequados, que LP-52 consegue se ligar de forma eficaz à albumina sérica humana (HSA), o que aumenta o tempo de semi vida *in vivo* e a atividade inibitória viral (22).

Por fim, as citotoxicidades de T-20, LP-40, LP-50, LP-51 e LP-52 foram avaliadas em linhagens de células (TZM-bl, MT-4, e HEK293T) e células mononucleares. Foram obtidas altas concentrações citotóxicas para todos os inibidores, o que indica que todos possuem elevada seletividade terapêutica (22).

Segundo Chong *et al*, LP-52, é o mais potente inibidor de fusão, ativo contra HIV-1, HIV-2 e SIV, reportado até a data (22).

Conclusão

Visto a necessidade de se pesquisar novos fármacos para o tratamento da infecção pelo HIV, a etapa de fusão do vírus com a membrana da célula alvo tem sido considerada um alvo ideal para o desenvolvimento de antirretrovirais.

A enfuvirtida demonstrou que péptidos inibidores de fusão são viáveis para o tratamento do HIV e abriu portas para o futuro desenvolvimento de inibidores similares. Assim, mais variantes da enfuvirtida foram sendo estudadas, cada uma delas apresentando certas vantagens relativamente à enfuvirtida. O T1249, protótipo de segunda geração, mostrou ser mais potente que a enfuvirtida, embora apresentasse problemas que levassem à sua descontinuação. Após tomar conhecimento de que, conjugar um péptido e um lípido era a forma mais eficiente de se construir inibidores de fusão e após se descobrir a importância do gancho M-T, houve a possibilidade de se desenvolverem os chamados lipopéptidos. Os lipopéptidos foram surgindo, desde LP-11 e LP-19, após a conjugação de lípidos com péptidos desenvolvidos a partir do gancho M-T, o HP23 e o 2P23, até LP-40 e LP-46, ao se substituir o o TRM de T-20 e T1249 por lípidos (C16) respetivamente. Estes lipopéptidos possibilitaram que se chegasse aos mais novos lipopéptidos, como LP-50 e LP-51, após a refinação de LP-40, e por fim, ao LP-52, por otimização de LP-51 com resíduos de LP-46.

LP-50 e LP-51 mostraram aumentar a conformação α -helicítica e estabilidade de ligação, atividade aumentada em inibir diferentes subtipos e fenótipos de HIV-1, e também isolados de HIV-2 e SIV. Além disso, exibiram alta atividade antiviral e longo tempo de semi-vida, alta seletividade terapêutica e sem efeitos adversos quando injetados nos modelos de macacos. Comparados aos modelos anteriores, LP-50 e LP-51 foram mais eficientes em tratar a infecção por SHIV em macacos infetados. Outra importância é o facto de também conseguirem tratar a infecção por HIV-2. Como inibidores de entrada, eles também podem ser utilizados em profilaxia. Em estudos mais recentes, os cientistas ficaram surpreendidos com o LP-52, que mostrou ainda mais potência na estabilidade de ligação e atividade antiviral, sendo considerado o mais potente inibidor de fusão até a presente data.

Os estudos efetuados não só oferecem promissores candidatos para o tratamento da infecção por HIV como também permitem a elucidação do mecanismo de fusão e entrada dos retrovírus e a sua inibição.

Referências Bibliográficas

1. Sharp PM, Hahn BH. Origins of HIV and the AIDS pandemic. Cold Spring Harb Perspect Med [Internet]. 2011;1(1):a006841. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22229120><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3234451>
2. Cary DC, Fujinaga K, Peterlin BM, Cary DC, Fujinaga K, Peterlin BM. Molecular mechanisms of HIV latency. 2016;126(2):448–54. Available from: <http://www.crosscomm.net/blogs/web-strategy/usability/what-makes-good-website/>
3. Lu L, Yu F, Cai L, Debnath AK, Jiang S. Development of Small-molecule HIV Entry Inhibitors Specifically Targeting gp120 or gp41. Curr Top Med Chem [Internet]. 2016;16(10):1074–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26324044><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4775441>
4. World Health Organization. HIV/AIDS. [Internet]. 2019 [cited 2019 Jul 3]. Available from: <https://www.who.int/gho/hiv/en/>
5. Komano J, Futahashi Y, Urano E, Miyauchi K, Murakami T, Matsuda Z, et al. The interaction of HIV-1 with the host factors. Jpn J Infect Dis. 2005;58(3):125–30.
6. Centers for Disease Control and Prevention. About HIV/AIDS/ HIV Basics | HIV/AIDS [Internet]. Cdc.gov. 2019 [cited 2019 Jul 3]. Available from: <https://www.cdc.gov/hiv/basics/whatishiv.html> .
7. Brian G. Turner and Michael F. Summers*. Structural Biology of HIV. 1999;1–32.
8. Balint GA. Antiretroviral therapeutic possibilities for human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome. Pharmacol Ther. 2001;89(1):17–27.
9. Popper SJ, Sarr AD, Guèye-Ndiaye A, Mboup S, Essex ME, Kanki PJ. Low plasma human immunodeficiency virus type 2 viral load is independent of proviral load: low virus production in vivo. J Virol [Internet]. 2000;74(3):1554–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10627569><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC111493>

10. Freed EO. HIV-1 Replication. *Somat Cell Mol Genet* [Internet]. 2001;26(1):13–33. Available from: <https://doi.org/10.1023/A:1021070512287>
11. Cooper DA, Lange JMA. Peptide inhibitors of virus-cell fusion: Enfuvirtide as a case study in clinical discovery and development. *Lancet Infect Dis*. 2004;4(7):426–36.
12. Chan DC, Fass D, Berger JM, Kim PS. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell*. 1997;89(2):263–73.
13. Woollard SM, Kanmogne GD. Maraviroc: A review of its use in hiv infection and beyond. *Drug Des Devel Ther*. 2015;9:5447–68.
14. Zhu Y, Zhou Y, Wei Q, Cong Z, Qin C, Chong H, et al. Design of Novel HIV-1/2 Fusion Inhibitors with High Therapeutic Efficacy in Rhesus Monkey Models. *J Virol*. 2018;92(16):1–13.
15. Temesgen Z, Wright AJ. Antiretrovirals. *Mayo Clin Proc*. 1999;74(12):1284–301.
16. Mostashari Rad T, Saghaie L, Fassihi A. HIV-1 Entry Inhibitors: A Review of Experimental and Computational Studies. *Chem Biodivers*. 2018;15(10).
17. Arts EJ, Hazuda DJ. HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(4).
18. Richman DD, Margolis DM, Delaney M, Greene WC, Hazuda D, Pomerantz RJ. The Challenge of Finding a Cure for HIV Infection. *Science* (80-). 2009;(March):1304–7.
19. Matthews T, Salgo M, Greenberg M, Chung J, Demasi R, Bolognesi D, et al. ENFUVIRTIDE : THE FIRST THERAPY TO INHIBIT THE ENTRY OF HIV-1 INTO HOST CD4 LYMPHOCYTES. 2004;3(March).
20. Greenberg ML, Cammack N. Resistance to enfuvirtide, the first HIV fusion inhibitor. *J Antimicrob Chemother*. 2004;54(2):333–40.
21. Ingallinella P, Bianchi E, Ladwa NA, Wang Y-J, Hrin R, Veneziano M, et al. Addition of a cholesterol group to an HIV-1 peptide fusion inhibitor dramatically increases its antiviral potency. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106(14):5801–6.
22. Chong H, Zhu Y, Yu D, He Y. Structural and Functional Characterization of Membrane Fusion Inhibitors with Extremely Potent Activity against HIV-1, HIV-2, and Simian Immunodeficiency Virus. *J Virol* [Internet]. 2018;92(August):1–18. Available from: <http://doi.org/10.1128/JVI.01088-18>

23. KILBY JM, HOPKINS S, VENETTA TM, DIMASSIMO B, CLOUD GA, LEE JY, et al. Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. 1998;4(11):1302–7. Available from: <http://web.b.ebscohost.com.ez.sun.ac.za/ehost/pdfviewer/pdfviewer?sid=a6defeb3-fc93-4c53-a60e-bcb72f7a3429%40sessionmgr111&vid=1&hid=125>
24. He Y. Synthesized Peptide Inhibitors of HIV-1 gp41-dependent Membrane Fusion. *Curr Pharm Des.* 2013;19(10):1800–9.
25. Soria A, Cavarelli M, Sala S, Alessandrini AI, Scarlatti G, Castagna A. Unexpected Dramatic Increase in CD4+ Cell Count in a Patient With AIDS After Enfuvirtide Treatment Despite Persistent Viremia and Resistance Mutations. *J Med Virol.* 2008;81(January):937–941.
26. Ding X, Zhang X, Chong H, Zhu Y, Wei H, Wu X, et al. Enfuvirtide (T20)-Based Lipopeptide Is a Potent HIV-1 Cell Fusion Inhibitor: Implications for Viral Entry and Inhibition. 2017;91(18):1–20.
27. Berkhout B, Eggink D, Sanders RW. Is there a future for antiviral fusion inhibitors? *Curr Opin Virol* [Internet]. 2012;2(1):50–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2012.01.002>
28. Zhu Y, Zhang X, Ding X, Chong H, Cui S, He J, et al. Exceptional potency and structural basis of a T1249-derived lipopeptide fusion inhibitor against HIV-1, HIV-2, and simian immunodeficiency virus. *J Biol Chem.* 2018;293(14):5223–334.
29. Pu, Wang, Xu, Lu, Jiang. Development of Protein- and Peptide-Based HIV Entry Inhibitors Targeting gp120 or gp41. *Viruses* [Internet]. 2019;11(8):705. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4915/11/8/705>
30. Chong H, Qiu Z, Sun J, Qiao Y, Li X, He Y. Two M-T hook residues greatly improve the antiviral activity and resistance profile of the HIV-1 fusion inhibitor SC29EK. *Retrovirology.* 2014;11(1):1–10.
31. Chong H, Xue J, Xiong S, Cong Z, Ding X, Zhu Y, et al. A Lipopeptide HIV-1/2 Fusion Inhibitor with Highly Potent In Vitro , Ex Vivo , and In Vivo Antiviral Activity . *J Virol.* 2017;91(11):1–13.